



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS EN TRES FAMILIAS CON INSENSIBILIDAD A LOS ANDROGENOS"

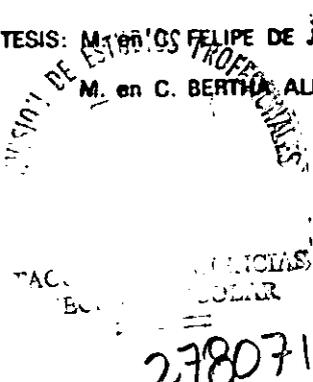
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA LUIS RAMOS TAVERA

DIRECTORES DE TESIS: M. en C. FELIPE DE JESUS VILCHIS URIBE M. en C. BERTHA ALICIA CHAVEZ CANO

MEXICO, D. F.

2000.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales  
**Presente.**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**“MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS  
EN TRES FAMILIAS CON INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS”**

realizado por **RAMOS TAVERA LUIS**

Con número de cuenta 9133862-4 pasante de la carrera de BIOLOGÍA.  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de tesis M. en C. Felipe de Jesús Vilchis Uribe

Propietario M. en C. Bertha Alicia Chávez Cano

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Suplente Dra. María Elena Calderón Segura

Suplente M. en C. Héctor Martín Abundis Manzano

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

*Edna Maria Suarez Diaz*

Consejo Departamental de Biología.

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA



## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres por el apoyo incondicional durante el desarrollo de mi carrera académica.**

**A mis familiares y amigos.**

## **RECONOCIMIENTOS**

El trabajo experimental del presente estudio se realizó en el laboratorio de Bioquímica Hormonal del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Este trabajo fué financiado por el CONACYT (Proyecto 0010 P-M).

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>Andrógenos</b> .....	2-4
<b>Mecanismo de acción de los andrógenos</b> .....	5-6
<b>Diferenciación sexual</b> .....	7-9
<b>Receptor de andrógenos</b> .....	10-13
<b>Síndrome de insensibilidad a los andrógenos</b> .....	14-15
<b>OBJETIVO</b> .....	16
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>Sujetos</b> .....	18-19
<b>Extracción de DNA</b> .....	20-21
<b>Amplificación del DNA mediante la reacción en     cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	22-24
<b>Polimorfismo conformacional de cadena simple</b> .....	25-26
<b>Secuenciación</b> .....	27-29
<b>RESULTADOS</b> .....	30-34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35-38
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39-47
<b>GLOSARIO</b> .....	48-50

## RESUMEN

El Receptor de Andr6genos (RA), es miembro de una superfamilia de receptores nucleares, necesario para la diferenciaci6n sexual, desarrollo y expresi6n del fenotipo masculino. El gen del RA se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12), y abarca m1s de 90 Kb del DNA gen6mico, su regi6n codificante comprende 8 exones (2757 pb) que al traducirse da como resultado una prote6na de 110-114 kDa, en esta prote6na se han identificado 4 dominios diferentes: 1) dominio amino terminal, 2) dominio de uni6n al DNA, 3) regi6n bisagra y 4) dominio de uni6n a esteroides. Estudios recientes indican que las mutaciones en el gen del RA est1n asociadas con el S6ndrome de Insensibilidad a los Andr6genos (SIA), una alteraci6n caracterizada por defectos en la masculinizaci6n en individuos con cariotipo 46XY, estos defectos pueden originar fenotipos desde el totalmente femenino (SIA completo) hasta individuos con fenotipo masculino con ginecomastia, hipospadias y/o infertilidad (SIA parcial).

En el presente trabajo se analiz6 la regi6n codificante del RA en 3 pacientes (paciente 1 con SIA parcial, paciente 2 con SIA completo, paciente 3 con SIA parcial) mediante las t6cnicas de polimorfismo conformacional de cadena simple del DNA (SSCP) y analisis de secuenciaci6n.

En el paciente 1 se identific6 una mutaci6n puntual en el ex6n C, en esta mutaci6n existe una transici6n de una adenina por una guanina (G→A) en el cod6n 596 implicando una substituci6n del amino1cido alanina por treonina. En el paciente 2, una transversi6n (C→G) se localiz6 en el ex6n G, lo que implic6 un cambio de leucina a valina en el cod6n 830. En el paciente 3, se encontr6 una mutaci6n puntual en el ex6n H, la cual result6 en una transici6n (C→T) dando como resultado un cambio de amino1cido en el ex6n 870 (Ala→Val). Estos resultados demuestran la heterogeneidad cl6nica, molecular y funcional del SIA y demuestran el importante papel que desempe1a la expresi6n correcta del gen del RA en el dimorfismo sexual y en el desarrollo del fenotipo masculino.

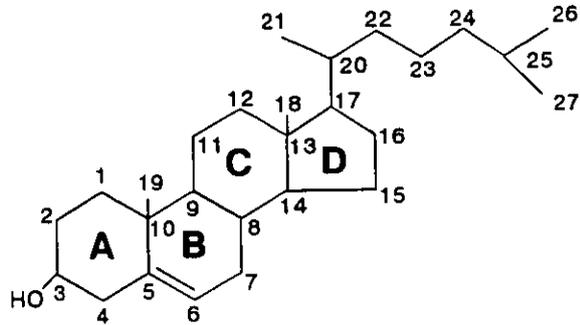
# INTRODUCCIÓN

## Andrógenos

Los andrógenos son moléculas de naturaleza lipídica de bajo peso molecular y al igual que todas las hormonas esteroideas (progestinas, glucocorticoides, mineralocorticoides y estrógenos) tienen como precursor esencial el colesterol. La biosíntesis de testosterona a partir del colesterol (Figura 1) involucra la presencia de 5 enzimas esenciales para su conversión: CYP11A1 (enzima que rompe la cadena lateral del colesterol), 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa), CYP17 (17 $\alpha$ -hidroxilasa), CYP17 (17,20 liasa), y 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa). Como consecuencia de esta biosíntesis la cadena lateral del colesterol se rompe en 2 etapas y la molécula de 27 átomos de carbono pasa a una molécula de 19 carbonos formando el núcleo androstano característico de todos los andrógenos naturales, además el esteroide adquiere la configuración  $\Delta^4$ , 3 ceto (Hanukogly 1992; Griffin & Wilson 1998; Lewis & Lee 1998).

La síntesis de los andrógenos se efectúa principalmente en las células de Leydig del testículo, y es regulada por la hormona luteinizante (LH) que es de naturaleza glicoprotéica compuesta de 2 cadenas polipeptídicas designadas  $\alpha$  y  $\beta$  y es liberada por la hipófisis anterior, a su vez la LH es regulada por la hormona liberadora de gonadotropinas, sintetizada en el hipotálamo anterior (Reyes-Fuentes & Veldhuis, 1993). La LH se une a receptores membranales específicos (Koo & col., 1991; Tsai-Morris & col., 1991), controlando la velocidad de reacción en la conversión del colesterol a pregnenolona, se ha observado que esto último constituye el paso limitante para la formación de testosterona (Griffin & Wilson, 1998).

Durante el desarrollo embrionario las hormonas esteroideas sexuales contribuyen a la determinación y diferenciación del sistema reproductor, así como al desarrollo del fenotipo masculino y femenino, en el adulto estas hormonas permiten el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y controlan la reproducción (Evans, 1988).



**Colesterol**

CYP11A1 ↓ (Enzima que rompe la cadena lateral del colesterol)

**Pregnenolona**

3β-HSD ↓ (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa)

**Progesterona**

CYP17 ↓ (17α-hidroxilasa)

**17-OH-Progesterona**

CYP17 ↓ (17,20-liasa)

**Androstendiona**

17β-HSD ↓ (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa)

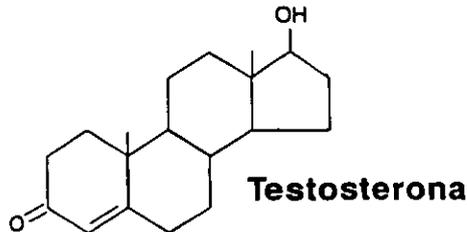


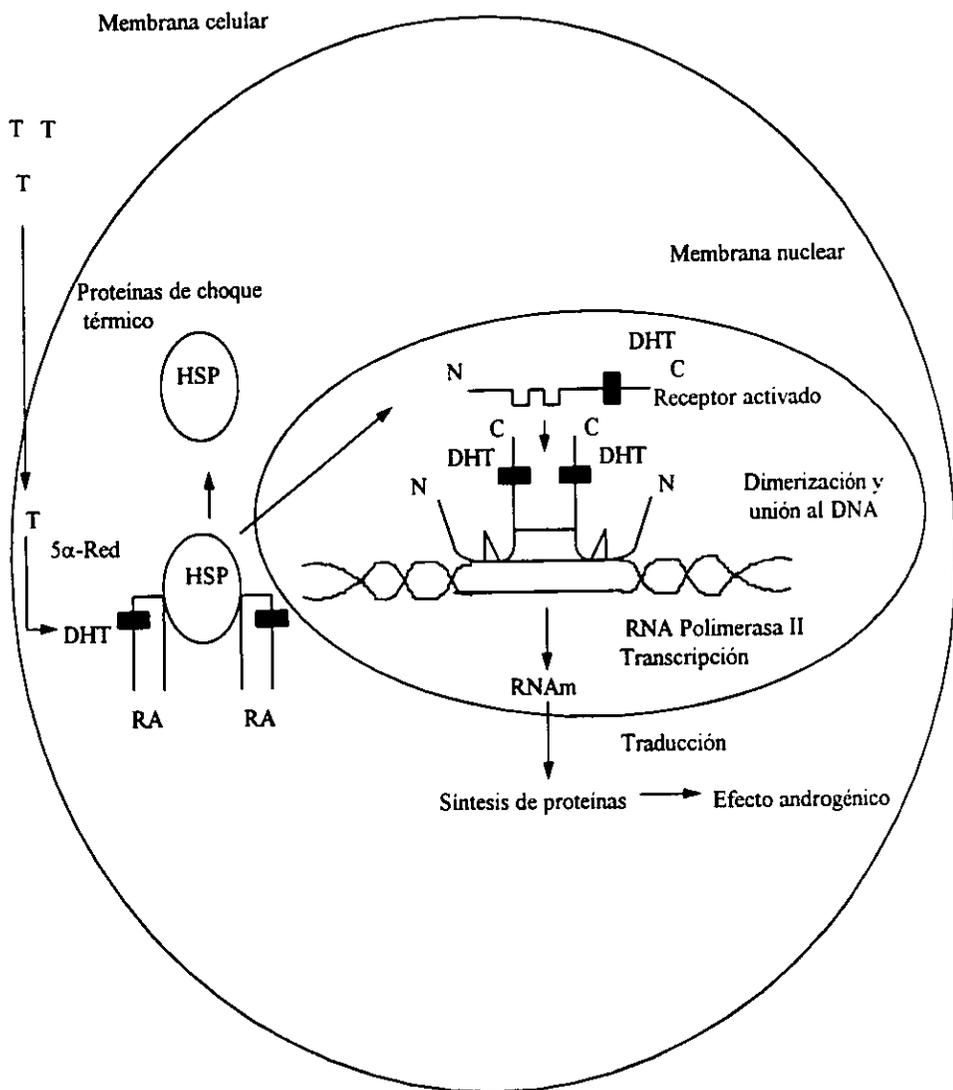
Figura 1. Metabolismo de colesterol a testosterona.

El control del desarrollo del fenotipo masculino normal y la regularización de la virilización se lleva a cabo por los andrógenos testosterona y 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (Grumbach & Conte, 1998). Estos andrógenos promueven la virilización normal de la región urogenital en el macho durante la embriogénesis y mantienen las funciones de los órganos sexuales durante la adolescencia. El andrógeno esencial secretado por los testículos es la testosterona, la cual controla la diferenciación de los conductos de Wolff (epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales), mientras que la DHT regula la diferenciación de la próstata, el desarrollo del seno urogenital y viriliza genitales externos (escroto, pene y uretra peneana) (Mooradian & col., 1987).

Una vez que son sintetizados en los órganos esteroideogénicos, los andrógenos son secretados a la circulación general, en la sangre la testosterona para ser transportada se une a proteínas plasmáticas, el transporte lo efectúan esencialmente la albúmina y la globulina transportadora de hormonas esteroideas sexuales. En la sangre de un hombre normal aproximadamente el 2% de la testosterona es libre (no unida), el 44% se enlaza a globulinas transportadoras de hormonas esteroideas sexuales y el 54% se enlaza a albúmina y otras proteínas (Griffin & Wilson, 1998).

## Mecanismo de acción de los andrógenos

La testosterona entra a la célula por difusión pasiva, donde puede ser transformada a DHT por la acción de la enzima  $5\alpha$ -esteroide reductasa (Andersson & Russell 1990; Wilson & col., 1993). Subsecuentemente, la testosterona o la DHT se unen intracelularmente a una fosfoproteína, el receptor de andrógenos (RA) (Kemppainen & col., 1992). La unión hormona-receptor induce un cambio conformacional y la transformación en el receptor (Pratt & Toft, 1997), así como una fosforilación adicional de residuos de serina localizados en el dominio  $\text{NH}_2$  terminal, y la disociación del receptor de las proteínas de choque térmico (HSP 90, HSP 70 y P59 las cuales mantienen inactivo al receptor en ausencia de hormona) y finalmente la activación del receptor (Lindquist & Craig, 1988). El complejo hormona-receptor dimerizado, regula la transcripción de genes blanco por unión a los elementos de respuesta hormonal que se ubican río arriba de las cajas TATA y CAAT (Beato 1989; Quigley & col., 1995). La iniciación transcripcional del gen es mediada por un conjunto general de factores de transcripción (TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH, TFIIA), de co-activadores y de la RNA polimerasa II (Mitchell & Tjian, 1989; Beato & Sánchez-Pacheco, 1996). Después de su transcripción y procesamiento, el RNAm viaja al citoplasma donde se ensambla a ribosomas citoplasmáticos y factores de iniciación, para la síntesis de nuevas proteínas (Dever 1999; Liljas 1999; Pestova & Hellen 1999) y, como consecuencia, la inducción de efectos androgénicos (Figura 2) (Grumbach & Conte, 1998). Se ha observado que la actividad del RA disminuye con el incremento prolongado de andrógenos, lo cual sugiere un mecanismo de autoregulación negativo (Wolf & col., 1993).



**Figura 2.** Mecanismo de acción de los andrógenos.

## Diferenciación sexual

El programa biológico de diferenciación sexual se realiza en 3 etapas sucesivas: 1) Cromosómica, 2) Gonadal y 3) Fenotípica.

El proceso de determinación se inicia en el momento de la fertilización, cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza al óvulo, que solo porta un cromosoma X, dando como resultado un macho (XY) o una hembra (XX) (Kofman-Alfaro & col., 1982).

El mecanismo subsecuente de diferenciación dependerá de la presencia de factores determinantes de la masculinización y feminización localizados en autosomas y cromosomas sexuales.

La presencia del cromosoma Y en mamíferos es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo (Kofman-Alfaro & col., 1982; Warne & Zajac, 1998).

La conversión del borde genital en una gónada bipotencial necesita de los genes SF1, WT1, LIM1 y GATA4 (Pritchard-Jones & col., 1990; Warne & Zajac 1998; Roberts & col., 1999; Swain & Lovell-Badge, 1999). La gónada bipotencial requiere del gen DAX 1 para el desarrollo del ovario y de los genes Wnt 4 y Wnt 7 para la diferenciación de las estructuras müllerianas (Bardoni & col., 1994; Parr & McMahon, 1998; Swain & col., 1998; Vainio & col., 1999), la diferenciación hacia el testículo requiere del gen SRY en unión con autosomas como el SOX9 (Wright & col., 1995; da Silva & col., 1996; Graves, 1997) y el DMT1 (Raymond & col., 1998; Raymond & col., 1999). El gen SRY (región determinante del sexo en el cromosoma Y) es de suma importancia en el macho para la formación de testículos (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993) (Figura 3).

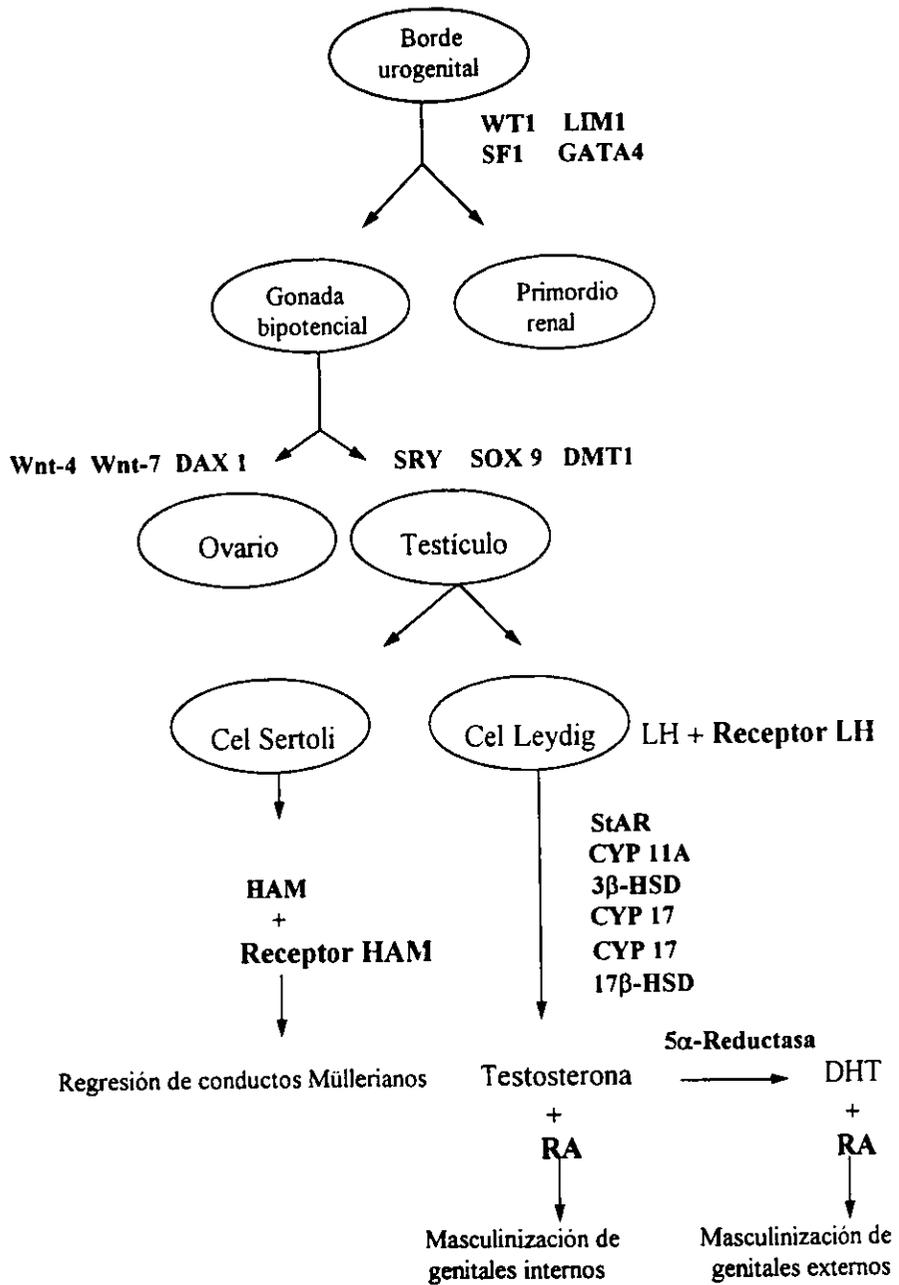


Figura 3. Eventos genéticos en la diferenciación sexual.

Durante la etapa indiferenciada (bipotencial) el epitelio del borde genital prolifera, esta capa de epitelio forma los cordones sexuales. En ambas gónadas XY y XX, los cordones sexuales continúan conectados a la superficie del epitelio (Rey & Picard, 1998). Durante el desarrollo fetal las células mesenquimales intersticiales del testículo se diferencian en las células de Leydig secretoras de la hormona masculinizante, testosterona. Las células de los cordones testiculares se diferencian en las células de Sertoli, las cuales secretan la hormona antimülleriana (HAM) (Rey & Picard, 1998).

En las células de Sertoli se desarrolla notablemente el retículo endoplásmico rugoso que caracteriza a las células con capacidad para secretar polipéptidos. Por otra parte las células de Leydig se caracterizan por tener un gran desarrollo de retículo endoplásmico liso y la presencia de crestas tubulares en sus mitocondrias, ambas estructuras son típicas de células secretoras de esteroides (Kofman-Alfaro & col., 1982).

En las hembras, las células germinales permanecen en el epitelio de la gónada, a diferencia de las células germinales en machos, las cuales continúan proliferando hacia la porción medular conjuntamente con los cordones sexuales. Estos cordones sexuales migran hacia la porción medular y se van formando trabéculas, cada cordón sexual es fragmentado y dará origen a un cordón seminífero. Los cordones seminíferos quedan conectados al *rete testis* y éstos a su vez forman conexiones con los túbulos del metanefros (Jost & col., 1973; Rey & Picard, 1998).

La formación del fenotipo masculino involucra la secreción de hormonas testiculares que promuevan el desarrollo de los conductos de Wolff (testosterona) y causan la atrofia de los conductos de Müller (HAM). La testosterona causa la diferenciación de los derivados Wolffianos (epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales) y permite el desarrollo del escroto y pene. (Griffin & Wilson, 1998; Grumbach & Conte, 1998). La ausencia embrionaria de testículo y por lo tanto de sus productos de secreción conducen al desarrollo del fenotipo femenino. La ausencia de hormona antimülleriana permite el desarrollo de los conductos müllerianos en trompas de falopio, útero y la porción superior de la vagina y por otra parte, la ausencia de testosterona origina la regresión y desaparición de los conductos Wolffianos (Kofman-Alfaro & col., 1982). La presencia de un RA funcional es necesario para la diferenciación sexual normal (Quigley & col., 1995).

## Receptor de andrógenos

Los receptores de esteroides unidos a su ligando, actúan como activadores transcripcionales intracelulares, por enlace a elementos reguladores de hormonas en genes específicos para desatar una cascada de eventos transcripcionales (Yamamoto, 1985; Simental & col., 1991).

El receptor de andrógenos es miembro de una superfamilia de receptores nucleares, agrupado conjuntamente con el receptor de glucocorticoides (RG), el receptor de mineralocorticoides (RM) y el receptor de progesterona (RP), un grupo de proteínas relacionadas por su secuencia, que posiblemente evolucionaron mediante un proceso de duplicación y divergencia a partir de un gen ancestral común (Amero & col., 1992; Thornton & Kelley, 1998). Este grupo está relacionado por su alta homología en su secuencia de aminoácidos, la cual contiene una región central de unión al DNA que está altamente conservada (Evans, 1988) y por su capacidad de activar la transcripción de un gen blanco vía elementos de respuesta hormonal (ERH), estos ERH consenso para los receptores nucleares son secuencias muy similares aunque contienen algunas diferencias (Beato, 1989), se incluye a su vez una subfamilia de factores transcripcionales nucleares que contienen al receptor de estrógenos (RE), al receptor de hormonas tiroideas ( $RT\alpha$  y  $RT\beta$ ), al receptor de vitamina D y al receptor del ácido retinóico (Quigley & col., 1995). Por lo tanto, es posible que estos dos subgrupos se hayan separado tempranamente por un proceso de divergencia en la evolución de la superfamilia de los receptores nucleares a esteroides (Beato & col., 1989).

El DNA complementario (DNAc) que codifica para el RA fue clonado por Lubahn y colaboradores en 1988 (a), quienes demostraron que el RA contiene una región de unión al DNA conservada rica en cisteínas, y además demostraron la localización del RA humano en el cromosoma X, en Xq 11-12 (Lubahn & col., 1988 b).

El gen del RA está localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq) de marsupiales, monotremas y mamíferos euterios, lo cual sugiere que esta región se ha conservado en estos tres grupos desde hace 150 millones de años a partir de un ancestro común (Spencer & col., 1991).

El RA es un gen de copia simple y tiene un tamaño de 75 a 90 kilobases (Kb), la región codificante tiene aproximadamente 2757 pares de bases, comprende 8 exones que son designados de la A-H o 1-8, están separados por intrones algunos de ellos muy grandes (de más de 26 Kb) (Quigley & col., 1995). El promotor del gen del RA humano (RAh) carece de las cajas TATA/CCAAT y potencialmente los elementos reguladores consisten de una pequeña caja GC, una amplia cantidad de homopurinas y contienen sitios de unión falsos para el factor de transcripción SP1 característico de los promotores de mantenimiento (Faber & col., 1991; Faber & col., 1993).

El gen del RA codifica para una proteína de aproximadamente 919 amino ácidos (aa) con un peso molecular de 98,845 D. Estructuralmente el RA comprende 4 dominios funcionales principales: 1) un dominio amino terminal, 2) un dominio de unión al DNA, 3) una región bisagra y 4) un dominio de unión al esteroide (Brinkmann & col., 1989; Quigley & col., 1995) (Figura 4).

El dominio amino terminal es codificado por el exón 1 del gen del RA y comprende más de la mitad del receptor (1-537 residuos de aa), es una región hipervariable comparada con la de los otros miembros de la familia de receptores esteroides y es la región menos homóloga en secuencia (Evans, 1988). Contiene un número amplio de aminoácidos homopoliméricos, el que presenta más repeticiones en esta región es una poliglutamina de aproximadamente  $21 \pm 2$  residuos, y es codificado por la región repetitiva del triplete polimórfico CAG, además este dominio comprende los 2 sitios de iniciación transcripcional (SIT 1 y SIT 2) (Quigley & col., 1995). Este dominio y el dominio carboxilo terminal actúan para inhibir el transporte nuclear del receptor no ligado al andrógeno (Simental & col., 1991) y a su vez este dominio inhibe la dimerización del RA y su enlace al DNA en ausencia del ligando (Wong & col., 1993).

El dominio de unión al DNA es codificado por los exones 2 y 3, y está localizado entre los aa 538 al 627, comprende una región central rica en cisteínas, 4 residuos de cisteína están presentes en todos los receptores nucleares a esteroides, los cuales se enlazan a un ión de zinc en cada una de las 2 secuencias, formando estructuras denominadas dedos de zinc. El ión de zinc es necesario para mantener la actividad del dominio de unión al DNA (Grumbach & Conte, 1998). El primer dedo de zinc especifica el

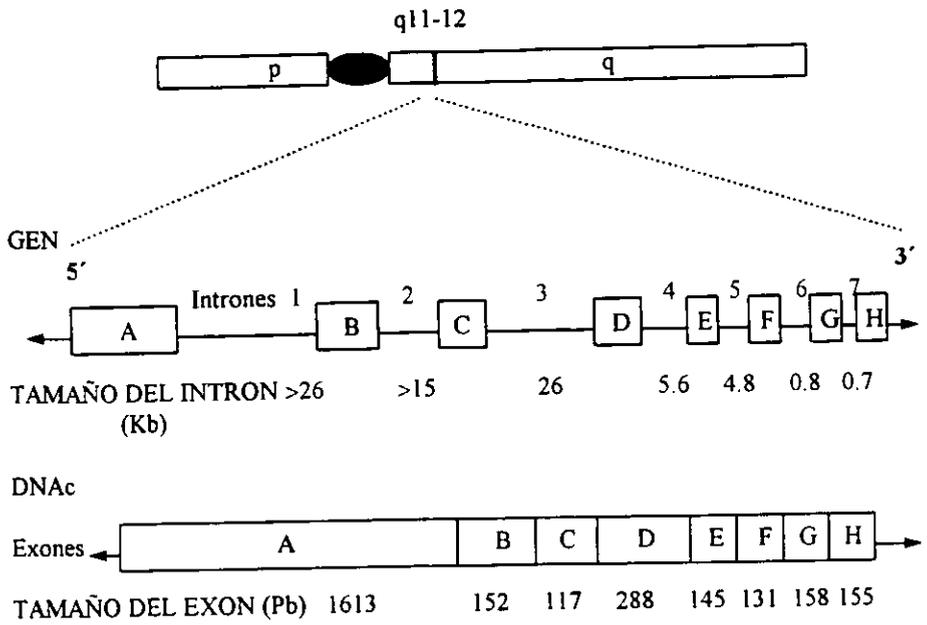
reconocimiento del receptor a los elementos de respuesta a andrógenos y es codificado por el exón 2 y el segundo dedo de zinc es el responsable de regular la dimerización durante su asociación al DNA y es codificado por el exón 3. Esta secuencia de residuos de cisteína está altamente conservada en los receptores hormonales lo cual revela una significativa similaridad sobre una divergencia evolutiva (Evans, 1988). El primer dedo de zinc es la región más altamente conservada, es relativamente más hidrofílica y tiene pocos aa básicos que interactúan con el DNA (Honda & col., 1993, Thornton & Kelley, 1998). El segundo dedo de zinc (COOH terminal) es el menos conservado, es rico en residuos de lisina y arginina y es altamente básico (Evans, 1988). Esta región de unión al DNA es absolutamente necesaria para la activación transcripcional, dimerización y transporte nuclear (Simental & col., 1991).

La región bisagra es codificada por la porción 5' del exón 4 y contiene las señales de localización nuclear, las cuales modulan la transferencia del RA al interior del núcleo. Esta secuencia se localiza entre los aminoácidos 628 a 657 y contiene característicamente aa básicos (Quigley & col., 1995).

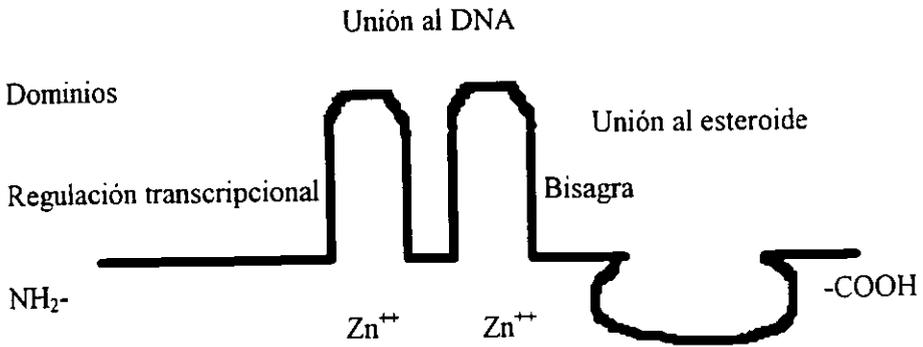
La región carboxilo terminal es codificada por la porción 3' del exón 4 y por los exones 5 al 8; esta secuencia se encuentra localizada en los aa 658 a 919 y comprende el sitio de unión al esteroide. La principal función del dominio de unión al esteroide es la especificidad y la alta afinidad de unión a andrógenos (Quigley & col., 1995) y también su asociación directa con las proteínas de choque térmico que mantienen inactivo al receptor (Beato, 1989; Smith & Toft, 1993). El dominio de unión a esteroides reprime la actividad transcripcional en la ausencia de andrógenos y de igual forma regula la capacidad activadora del RA (Jenster & col., 1991; Simental & col., 1991).

Haciendo una comparación entre el dominio de unión al DNA, el dominio de unión a esteroides y la región bisagra, esta última es la de más baja homología entre el RA y los otros receptores nucleares a esteroides (Quigley & col., 1995).

**CROMOSOMA X**



**RECEPTOR DE ANDROGENOS**



**Figura 4.** Localización y organización estructural del gen del RA en el cromosoma X (Quigley & col., 1995).

## **Síndrome de insensibilidad a los andrógenos**

El síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA) se origina por alteraciones en el gen del RA que se hereda de manera recesiva ligado al cromosoma X y se genera en personas con cariotipo 46XY (Hiort & col., 1996), quienes presentan testículos bilaterales, regresión normal de los conductos müllerianos y secreción normal de testosterona.

El SIA se clasifica tradicionalmente en subgrupos clínicos basados en el fenotipo de los genitales externos (SIA completo y SIA parcial) o en subgrupos bioquímicos acorde a la ausencia o presencia de unión de los andrógenos a su receptor, estos estudios son efectuados en fibroblastos de piel genital mantenidos en cultivo (Sultan & col., 1993; Quigley & col., 1995).

El SIA completo es un desorden vinculado al cromosoma sexual X. Los individuos que la padecen presenta un cariotipo 46 XY, con testículos bilaterales que pueden encontrarse en el abdomen o en el canal inguinal, por lo que frecuentemente presentan hernias, tienen genitales externos femeninos, en ocasiones con poco desarrollo del clítoris y labios mayores o menores, ausencia de vello sexual, no presentan útero y sólo tienen el tercio inferior de la vagina, raramente aparecen estructuras de Müller, en algunos casos existen las trompas de falopio. Desarrollan una excelente feminización en la pubertad, no tienen acné y presentan un desarrollo mamario normal, la feminización de los pechos y del cuerpo aparece en respuesta a la producción de estrógenos que se sobrepone a los efectos de los andrógenos, la maduración del esqueleto es muy similar a la de los hombres normales (Quigley & col., 1995; Sinnecker & col., 1997).

El SIA parcial presenta fenotipos muy variables, en algunos casos son completamente femeninos en la infancia, manifestando evidencias de respuesta limitada a andrógenos en la adolescencia, en otros casos estos individuos tienen un fenotipo femenino con clitoromegalia media y/o ligera fusión labial. Como evidencia a la respuesta a andrógenos las estructuras de Wolff se desarrollan de forma variable en las formas de SIA parcial, dependiendo del grado de sensibilidad/resistencia a los andrógenos, el epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales varían mucho de forma desde muy rudimentaria a desarrollada completamente (Quigley & col.,

1995; Sinnecker & col., 1997).

Los rasgos clínicos comprenden una amplia gama de manifestaciones y anomalías en el fenotipo, de igual forma el RA comprende anomalías bioquímicas agrupadas en 4 categorías con fundamento en la unión de los andrógenos en cultivo de fibroblastos genitales de piel: 1) enlace negativo al receptor, 2) enlace reducido al receptor, 3) enlace anormal cualitativo y 4) enlace positivo al receptor (Marcelli & col., 1992).

Usando técnicas de biología molecular se han identificado una gran variedad de defectos en el gen del RA en las diversas formas de SIA (Batch & col., 1992; De Bellis & col., 1992; McPhaul & col., 1992; Quigley & col., 1992; Hiort & col., 1993; Beitel & col., 1994). Estos defectos son: 1) defectos estructurales principales del gen del RA (deleciones completas o parciales en el gen), 2) defectos estructurales menores del gen del RA (deleciones o inserciones de 1 a 4 pares de bases), 3) mutaciones de una sola base, la cual induce la formación de un codón prematuro de terminación o una alteración del empalme en la formación del RNAm, 4) mutaciones de una sola base, la cual da como resultado la substitución de un aminoácido en el receptor y 5) expansión de un trinucleótido repetido (De Bellis & col., 1994; Quigley & col., 1995).

## **OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Identificar y determinar alteraciones estructurales y/o mutaciones en el gen del receptor de andrógenos (RA) en pacientes con síndrome de insensibilidad a los andrógenos.

## JUSTIFICACIÓN

El estudio de pacientes con insensibilidad a los andrógenos inició prácticamente hace 50 años, los análisis iniciales indicaban que individuos con cariotipo (46XY) y gónadas (testículos) masculinas no lograban virilizarse a pesar de producir hormonas androgénicas de una manera normal. Con el avance de los estudios bioquímicos se supo que en estos pacientes la falla radicaba en la ausencia o en el mal funcionamiento del receptor de andrógenos, y debido a que era una entidad heredada de una manera recesiva ligada al cromosoma X, se predecía la presencia del gen del receptor de andrógenos en este cromosoma.

En 1988, dos grupos (Chang & col., Lubahn & col.) publicaron de manera simultánea la secuencia completa del DNA complementario del receptor de andrógenos humano. Una vez que se tuvo este conocimiento fue posible estudiar ampliamente el gen en pacientes con insensibilidad a los andrógenos, a la fecha se han identificado más de 200 mutaciones diferentes.

Estos pacientes representan modelos naturales en los cuales existen mutaciones en el gen del receptor de andrógenos y el análisis molecular del gen y la detección de alteraciones en el mismo, nos ayuda a conocer los sitios del receptor indispensables para su actividad funcional normal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SUJETOS

Se estudiaron 3 pacientes con SIA, los cuales presentaron un cariotipo masculino 46, XY normal.

**Paciente 1:** Individuo de 6 meses de edad, presenta una insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos con ambigüedad de genitales detectada desde el nacimiento, así como agenesia del riñón derecho. El riñón izquierdo está presente y funciona normalmente. Presenta un falo de 2.1 cm de longitud, escroto bifido, gónadas palpables en escroto de más de 1 cm. Se le realizó una prueba de estimulación con enatato de testosterona presentando un incremento del falo de 0.8 cm de longitud y 0.2 cm de diámetro. El meato urinario localizado en el periné. No se observa introito vaginal. Los testículos con longitud de 1.4 cm y consistencia normal, uretra de tipo masculino con restos Mülllerianos en su porción prostática. La relación T/DHT(1:5) fué normal.

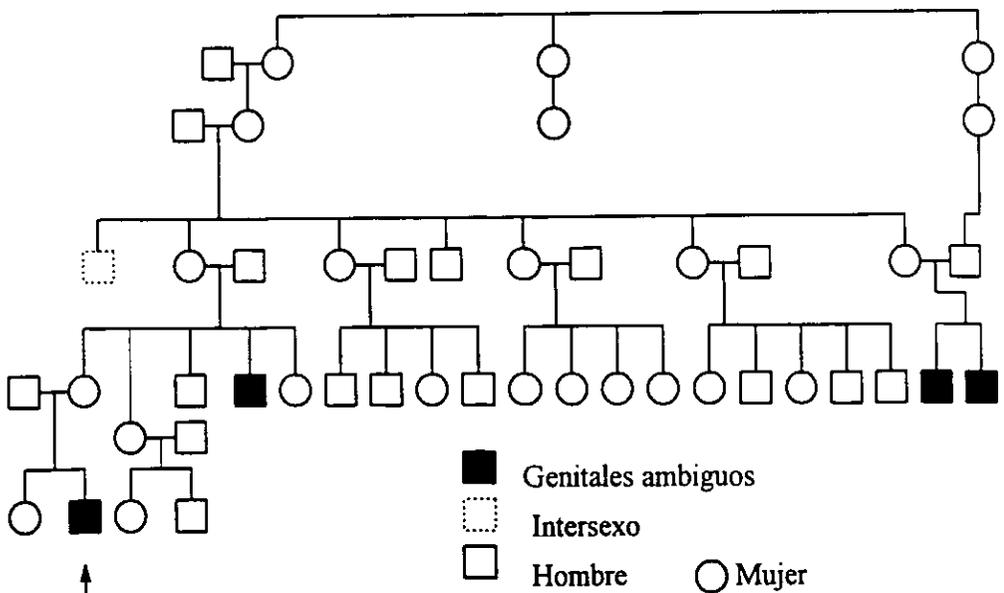


Figura 5. Árbol genealógico del paciente 1 (↑).

Paciente 2: Individuo de 17 años de edad presenta insensibilidad completa a la acción de los andrógenos con un fenotipo femenino, glándulas mamarias en Tanner IV-V, ausencia de vello axilar y púbico, genitales con hipoplasia de labios menores, no se observa clitoris, agenesia uterina y trompas de falopio, gónadas presentes en el canal inguinal. Presenta amenorrea primaria, el paciente refiere tener una hermana de 15 años que todavía no ha menstruado, con crecimiento y desarrollo normal. Su árbol genealógico se presenta en la figura 6.

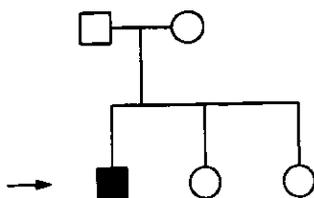


Figura 6. Árbol genealógico del paciente 2 (→)

Paciente 3: Individuo de 24 años de edad presenta un fenotipo masculino con ginecomastia bilateral (Tanner III) y disminución en la viabilidad de los espermatozoides (vida media de 24 hrs). Presenta algunos signos de hipoandrogenismo como voz aguda, ausencia de vello corporal y vello púbico ginecoide. Presenta niveles normales de testosterona: 8.06 ng/ml (normal: 3.7 a 9.5 ng/ml), estradiol de 91.95 pg/ml (normal: 10 a 60 pg/ml) y gonadotropinas dentro de los valores normales. Su árbol genealógico presenta antecedentes familiares con ginecomastia en 2 tíos maternos (Figura 7).

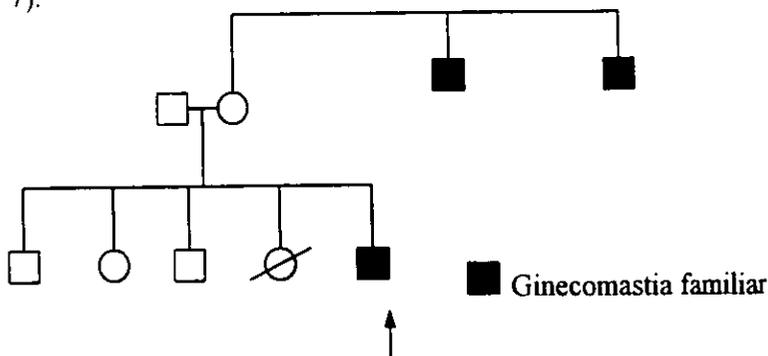


Figura 7. Árbol genealógico del paciente 3 (↑).

## Material

Todo el material utilizado fue esterilizado en autoclave o bien se usó material estéril desechable. Todos los reactivos son grado biología molecular y las soluciones se esterilizaron en autoclave o por filtración.

## EXTRACCIÓN DE DNA

### Soluciones:

#### Solución Sacarosa-tritón 2X

Sacarosa 219 g (0.64 M)

Tris base 2.42 g (0.02 M)

MgCl<sub>2</sub> 2.03 g (0.01 M)

Tritón X100 20 ml (2%)

llevar a 1 L con H<sub>2</sub>O dd

Esterilizar por filtración y guardar a 4°C

#### Proteínasa K (5 mg/ml)

Pesar y disolver en H<sub>2</sub>O dd

#### NaCl saturado

NaCl 350 g

Llevar a 500 ml con H<sub>2</sub>O dd

Esterilizar en autoclave

#### Solución de Lisis-Nuclear

Tris-Base 1.21 g (10 mM)

NaCl 23.4 g (400 mM)

Na<sub>2</sub>EDTA 0.75 g (2 mM)

llevar a 1 L con H<sub>2</sub>O dd

Esterilizar en autoclave

#### EDTA 0.5 M

Na<sub>4</sub>EDTA 190.1 g

Llevar a pH=8

Llevar a 500 ml con H<sub>2</sub>O dd

Esterilizar en autoclave

#### SDS 20%

SDS 200 g

H<sub>2</sub>O dd 1 L

Esterilizar por filtración

#### Solución TE

Tris 1M 1.0 ml

EDTA 0.5 M 0.02 ml

Llevar a 100 ml con H<sub>2</sub>O dd

Esterilizar en autoclave

### Método:

- 1) Se tomaron 10 ml de sangre periférica de individuos normales y de pacientes con SIA, que inmediatamente se mezclaron con 0.2 ml de EDTA 0.5 M.

- 2) Las muestras se colocaron en hielo.
- 3) Se adicionaron 25 ml de solución sacarosa-tritón 2X .
- 4) Se adicionaron 15 ml de H<sub>2</sub>O dd y se mezcló por inversión.
- 5) Se dejó reposar en hielo durante 10 min mezclando varias veces por inversión.
- 6) Se centrifugó a 1000 xg por 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se retuvo el precipitado. Si era necesario se lavaba con 5 ml de solución de sacarosa-tritón 1X y se centrifugaba en las mismas condiciones.
- 7) Se adicionaron 3 ml de solución de lisis-nuclear y se resuspendió el precipitado.
- 8) Se adicionaron 108 µl de SDS al 20 % y 100 µl de proteinasa K y se mezcló.
- 9) El tubo se incubó a 37°C al menos durante 2 horas.
- 10) Una vez que se completó la incubación, la muestra se transfirió a tubos de polipropileno de 15 ml y se le adicionó 1 ml de una solución de NaCl saturada y se agitó vigorosamente por 15 segundos.
- 11) Se centrifugó a 1000 xg por 15 min a temperatura ambiente.
- 12) El sobrenadante se transfirió a otro tubo de polipropileno de 15 ml.
- 13) Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión hasta la evidente precipitación del DNA.
- 14) El DNA precipitado se sacó con una pipeta Pasteur sellada.
- 15) Se introdujo la punta de la pipeta con el DNA en un vaso de precipitado lleno de etanol al 70% y se enjuagó moviendo suavemente la punta de la pipeta durante 30 segundos.
- 16) Se sacó la pipeta del etanol y se permitió que se secase al aire.
- 17) Se adicionaron 200 µl de solución TE a un tubo de microcentrifuga.
- 18) Cuando el DNA se secó en la punta de la pipeta, ésta se metió en la solución TE y se permitió que el DNA se desprendiera.
- 19) El DNA se dejó disolver a temperatura ambiente.
- 20) El DNA se cuantificó espectrofotométricamente y mediante este método también se verificó su pureza (260 nm=concentración y 260/280=relación de pureza).

## AMPLIFICACIÓN DEL DNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El gen del RA está constituido por 8 exones y 7 intrones. El exón A es muy grande por lo que para su estudio se dividió en 5 segmentos. Los exones del B al H se amplificaron individualmente usando oligonucleótidos sintetizados como iniciadores para la síntesis del DNA en la región intrónica adyacente a la zona de corte y empalme. Los oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo a la secuencia reportada por Lubahn y col. (1989) con algunas modificaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de cada exón del gen del RAh.

	SECUENCIA	AMPLIFICA
RA1	5' GCC TGT TGA ACT CTT CTG AGC	Exón A 1
RA2	GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT C 3'	
RA3	5' CAC AGG CTA CCT GGT CCT GG	Exón A 2
RA4	CTG CCT TAC ACA ACT CCT TGG C 3'	
RA5	5' GCT CCC ACT TCC TCC AAG GAC	Exón A 3
RA6	CGG GTT CTC CAG CTT GAT GCG 3'	
RA7	5' GCT GCG TAC CAG AGT CGC GAC TAC	Exón A 4
RA8	CTG GGA TAG GGC ACT CTG CTC ACC 3'	
RA9	5' GAC TTC ACC GCA CCT GAT GTG TGG	Exón A 5
RA10	CCA GAA CAC AGA GTG ACT CTG CC 3'	
Ba	5' AGG TTA ATG CTG AAG ACC	Exón B
Bb	TT TGA TAG GGC CTT GCC A 3'	
Ca	5' GTT TGG TGC CAT ACT CTG TCC AC	Exón C
Cb	CTG ATG GCC ACG TTG CCT ATG AA 3'	
Da	5' GGA GTT TAG AGT CTG TGA CCA GG	Exón D
Db	GAT CCC CCT TAT CTC ATG CTC CC 3'	
Ea	5' CAA CCC GTC AGT ACC CAG ACT G	Exón E
Eb	AGC TTC ACT GTC ACC CCA TCA C 3'	
Fa	5' CTC TGG GCT TAT TGG TAA ACT TCC	Exón F
Fb	GTC CAG GAG CTG GCT TTT CCC TA 3'	
Ga	5' CTT TCA GAT CGG ATC CAG CTA TCC	Exón G
Gb	CTC TAT CAG GCT GTT CTC CCT GAT 3'	
Ha	5' GAG GCC ACC TCC TTG TCA ACC CTG	Exón H
Hb	GGA ACA TGT TCA TGA CAG ACT GTA C 3'	

### Método:

Las reacciones (PCR) se efectuaron usando reactivos de Perkin-Elmer en un volumen total de 25  $\mu$ l, que contenían DNA genómico (1.5  $\mu$ l); oligonucleótido cebador 5' (1.5  $\mu$ M); oligonucleótido cebador 3' (1.5  $\mu$ M); mezcla de dNTPs (25  $\mu$ M); MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM); KCl (50 mM); Tris-HCl pH 8.3 (10 mM); dimetil sulfóxido (4%v/v) y 2.5 U de Taq (DNA) polimerasa (Ampli-Taq).

Se usó un termociclador Perkin-Elmer modelo 480 con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Temperatura de reasociación (Annealing).

	Temp 1	Temp 2	Temp 3
1	80°/30seg	94°/90seg	-----
25	94°/45seg	*/45seg	72°/45seg
1	94°/45seg	*/45seg	72°/3min

\*Temperatura específica por exones: A1= 65°C, A2= 65°C, A3= 65°C, B= 58°C, C= 58°C, D= 58°C, E= 58°C, F= 60°C, G= 62°C, H= 60°C.

### GELES DE AGAROSA

#### Soluciones:

##### Solución TBE 5X

Tris-Base            54 g  
Ácido Bórico        27.5 g  
EDTA 0.5 M, pH 8   20 ml  
llevar a 1 L con H<sub>2</sub>O dd  
Esterilizar por filtración

##### Solución de carga para DNA

Azul de bromofenol    0.25% p/v  
Cianol xileno            0.25% p/v  
Ficol 400                15%    p/v  
Disolver en H<sub>2</sub>O dd estéril  
Guardar a temperatura ambiente

**Método:**

- 1) Pesar 1 g de agarosa y disolverla en 100 ml de solución TBE 1X mediante calentamiento. Dejar enfriar hasta aproximadamente 40°C y agregar 0.7  $\mu$ l de bromuro de etidio, mezclar, vaciar al molde y dejar enfriar.
- 2) Transferir el gel de agarosa a una cámara de electroforesis horizontal y agregar solución TBE 1X suficiente para cubrir el gel.
- 3) Depositar alícuotas de 5  $\mu$ l de los productos de PCR obtenidos y mezclados con 3  $\mu$ l de solución de carga para PCR. En los pozos laterales depositar marcadores de peso molecular.
- 4) Correr la electroforesis a 100 Volts.
- 5) Observar en el transiluminador (Luz UV).

## POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SIMPLE (SSCP)

### Soluciones:

#### Solución de carga para SSCP

Formamida	95%	v/v
EDTA	20	mM
Azul de bromofenol	0.05%	p/v
llevar a 100% con H <sub>2</sub> O dd		

	SSCP gel de Acrilamida 8%		SSCP gel de Acrilamida 5.4%	
	70 ml	70 ml	70 ml	70 ml
H <sub>2</sub> O dd	29.85 ml	36.89 ml	35.91 ml	42.91 ml
Glicerol	7 ml	-----	7 ml	-----
TBE 5X	14 ml	14 ml	14 ml	14 ml
Ac/Bis(29:1)	18.66 ml	18.66 ml	12.6 ml	12.6 ml
PSA* 10%	0.49 ml	0.49 ml	0.49 ml	0.49 ml
TEMED	25 μl	25 μl	24.5 μl	24.5 μl

\*Persulfato de amonio

Con la finalidad de observar la existencia de alteraciones en el RA, se utilizó la técnica de SSCP descrita originalmente por Orita y col. (1989), a la cual se le hicieron algunas modificaciones.

## **Método:**

- 1) Se amplificaron mediante PCR los exones del RAh tanto de los pacientes como de los controles normales. Las PCR se efectuaron de la misma manera antes descrita pero añadiendo 5  $\mu$ Ci de dCTP marcado en  $\alpha$  con  $^{32}$ P.
- 2) Se verificó que las reacciones se hayan efectuado, corriendo alícuotas de 5  $\mu$ l en geles de agarosa al 1%.
- 3) Se tomaron alícuotas de 2  $\mu$ l de reacción y se les agregaron 28  $\mu$ l de solución de carga para SSCP.
- 4) Se calentaron a 94°C durante 5 min y se depositaron en hielo.
- 5) Se tomaron 3  $\mu$ l de cada muestra y se depositaron en geles de poliacrilamida.
- 6) Se corrieron a 250 V durante 18-20 h a temperatura ambiente en TBE 1X.
- 7) Al terminar la electroforesis, los geles se transfirieron a papel 3MM y se secaron en un desecador (Slab gel dryer, Savant) durante 1 h a 75°C.
- 8) El gel adherido al papel se colocó en un cartucho con pantallas intensificadoras y se expuso a una placa para rayos X (X-OMAT, Kodak) durante 2-3 h a -70°C.
- 9) Las placas se revelaron y se analizaron.

## SECUENCIACIÓN

### A) Purificación de productos de PCR para secuenciación

- 1) Los exones con alteraciones identificados mediante SSCP se amplificaron nuevamente mediante PCR.
- 2) Los segmentos amplificados se corrieron en geles preparativos de agarosa al 1% (Sambrook 1989), se usó bromuro de etidio para teñir los nucleótidos y la electroforésis se efectuó a 100 V.
- 3) Se cortó lo más pequeño posible el trozo de gel de agarosa que contenía el segmento amplificado.
- 4) El trozo de gel que contenía el segmento de DNA se colocó en una membrana de diálisis y se adicionaron 400  $\mu$ l de solución TBE 1X.
- 5) Se realizó una electroelución durante 15 min a 100 volts.
- 6) El DNA obtenido en TBE 1X se purificó en columnas Centricom 30 (Amicom), para ello se colocó la muestra en la columna y se llevó a 2 ml con H<sub>2</sub>O dd.
- 7) Las muestras se centrifugaron a 7500 rpm (rotor JA20 Beckman) durante 30 min a 4°C.
- 8) Se agregaron 2 ml de H<sub>2</sub>O dd a la columna y se centrifugó en las mismas condiciones.
- 9) La columna se invirtió sobre un tubo cónico y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min.
- 10) El producto obtenido se cuantificó espectrofotométricamente y una alícuota de 5  $\mu$ l se corrió en geles de agarosa al 1% para verificar la concentración y pureza.

## B) Reacción

Se efectuaron las reacciones con el estuche de secuenciación de USB Corporation (OH, USA). Estas reacciones contenían desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una concentración de 0.75  $\mu\text{M}$  cada uno; didesoxinucleótidos marcados radiactivamente [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ] (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) aproximadamente 0.225  $\mu\text{Ci}$  de cada uno; DNA (purificado) 100 ng; oligonucleótido cebador 16 pmol; termosecuensasa DNA polimerasa 8 U; todo en una solución Tris-HCl 26 mM a un pH de 9.5 y  $\text{MgCl}_2$  6.5 mM. El volumen final fue de 20  $\mu\text{l}$  el cual se alcanzó con  $\text{H}_2\text{O}$  dd. Las reacciones se sometieron a un ciclo de 80°C durante 30 seg, 94°C/90 seg; 30 ciclos de 94°C/45 seg, [58°C para el exón C, 62°C para el exón G o 60°C para el exón H]/45 seg, 72°C/45 seg, y un último ciclo similar a los anteriores pero con la última temperatura de 72°C durante 3 min.

Al terminar las reacciones, se adicionaron a cada tubo 4  $\mu\text{l}$  de solución para detener la reacción (95% formamida, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y cianol xileno al 0.005% FF).

Las muestras se calentaron a 70°C durante 5 min y posteriormente se llevaron a hielo también por 5 min.

## C) Electroforésis

### Soluciones:

#### Solución TTE (10X)

Tris base                    108 g

Taurina                     36 g

$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$         2 g

$\text{H}_2\text{O}$  dd    Llevar a 1 L

Esterilizar por filtración o autoclave

### Gel de acrilamida al 6% para secuenciación

	100 ml
Acrilamida	5.7 g
Bis-Acril	0.3 g
Urea	4.2 g
TTE 10X	10 ml
H <sub>2</sub> O dd	45 ml

Para 60 ml .....600 µl de PSA al 10%, TEMED 15 µl

- 1) Se prepararon geles de acrilamida-urea, se dejaron polimerizar al menos 1 h.
- 2) Los geles de acrilamida-urea se montaron en las cámaras de electroforesis, se usó como solución de corrida TTE 1X, y se precalentaron a 1800 V hasta alcanzar 50°C.
- 3) Se tomaron 3 µl de cada muestra y se depositaron en los geles. Se corrió la electroforesis a 1800 V hasta que llegara al frente la muestra.
- 4) Los geles se transfirieron a papel 3 MM, y se secaron durante 60 min a 75°C con vacío (Savant).
- 5) Los geles adheridos al papel 3 MM se expusieron a placas de rayos X, Bio Max-MR (Kodak) en cartuchos con pantallas intensificadoras. Se dejaron a temperatura ambiente de 12 a 16 h y se revelaron las placas.
- 6) Se leyeron las secuencias de los exones estudiados y se compararon con las secuencias de los controles y de las ya reportadas.

## RESULTADOS

El Análisis molecular del gen del RA en pacientes diagnosticados clínicamente con el SIA, se inició con la amplificación mediante PCR de cada exón del gen del RA, los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y comparados con un marcador de peso molecular (MPM) (Fig. 8 A), los resultados indicaron que todos los exones del gen del RA estudiados en los pacientes se amplificaron, y su tamaño fue el esperado y similar al de los controles normales, con base en lo cual se descartó una delección o inserción grande de bases en el DNA.

Posteriormente se analizó el gen del RA mediante SSCP, técnica en la cual fue muy importante que las muestras se sometieran a electroforésis en dos diferentes concentraciones de acrilamida (5.4% y 8%) con o sin glicerol al 10%, ya que en algunos geles era más evidente que en otros el corrimiento anormal de las cadenas de DNA.

Esta técnica permitió observar que en el paciente 1 existía una alteración en el exón C, a una concentración de acrilamida de 5.4% agregando glicerol, como se observa en la figura 8 B, en este mismo gel se estudiaron a dos parientes de la rama materna ( $P_H$  y  $P_P$ ) que presentaban también virilización incompleta.

En el paciente 2 se observó alteración en el patrón de migración electroforético en el exón G, que se hizo muy evidente al usar en el gel una concentración de acrilamida de 5.4% sin agregar glicerol (Fig. 8 B).

El análisis mediante SSCP del paciente 3, permitió ubicar la mutación en el exón H, ya que la migración de la muestra del sujeto afectado en un gel con 5.4% de acrilamida con glicerol al 10% fué muy diferente a la de los testigos normales (Fig. 8 B).

Una vez localizadas las alteraciones moleculares en estos pacientes, se procedió a secuenciar al exón alterado en cada paciente.

En el paciente 1, así como en su hermano y primo, se detectó una mutación puntual en el nucleótido 2148 de la región codificante del RA, y consistió en una transición (GCC→ACC), este cambio puntual originó al momento de la traducción la sustitución de una Alanina por una Treonina en el codón 596 (Fig. 9 y 10 A).

En el paciente 2 se determinó la presencia de una mutación de base simple en el exón G, que se localiza en el dominio de unión al esteroide. Al analizar la secuencia del exón G, la alteración consistió en una transversión C→G en la posición 2850, esta sustitución cambió el codón 830 de CTT (Leucina) a GTT (Valina), como se observa en las figuras 9 y 10 B.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del exón H en el paciente #3, permitió determinar una mutación puntual en la posición 2971, la alteración consistió en una transición C→T. El cambio de nucleótido en el codón 870 del gen del RA originó la sustitución de una Alanina (GCG) por una Valina (GTG) (Fig. 9 y 10 C). Estos resultados se enlistan en la tabla 2.

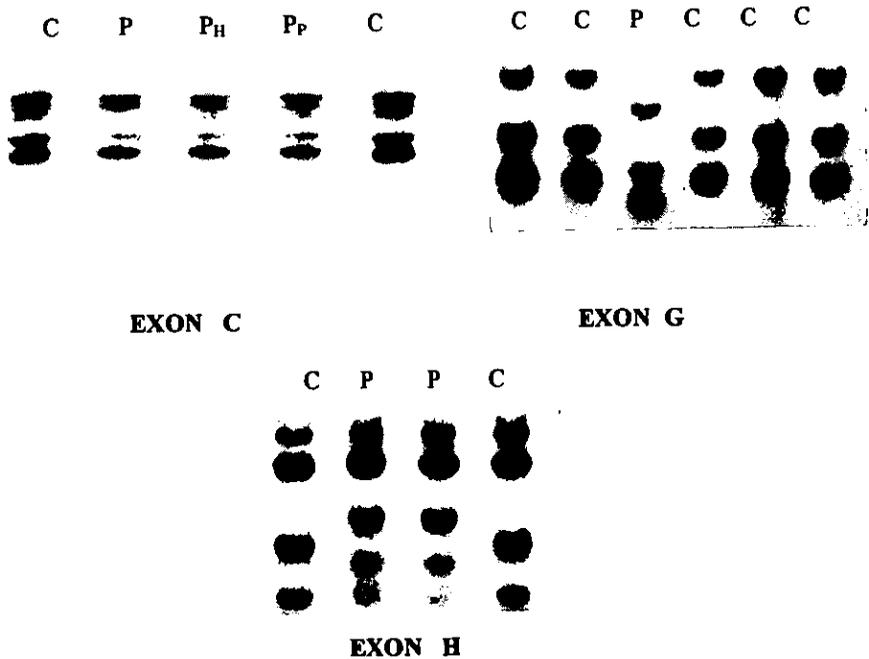
Tabla 2. Mutaciones en el gen del RA en pacientes con SIA.

Paciente	Exón	Base num	Cambio de base	Codón	Cambio de aa
1	C	2148	GCC a ACC	596	Ala → Thr
2	G	2850	CTT a GTT	830	Leu → Val
3	H	2971	GCG a GTG	870	Ala → Val

(A)

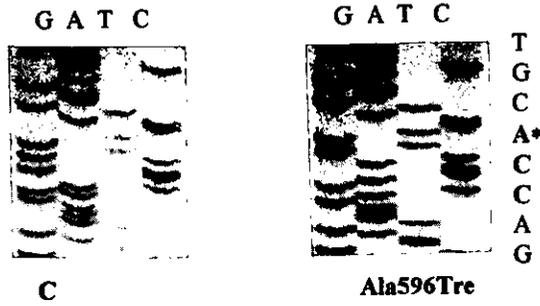


(B)

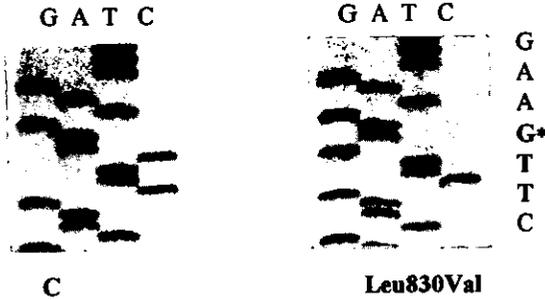


**Figura 8.** Análisis del gen del RA de pacientes con SIA (P) y sujetos control (C). Patrón de migración del exón H (amplificado mediante PCR) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (A). Patrón de migración electroforética de los exones C, G y H del RA, analizados mediante SSCP en geles de poliacrilamida al 5.4% (B).

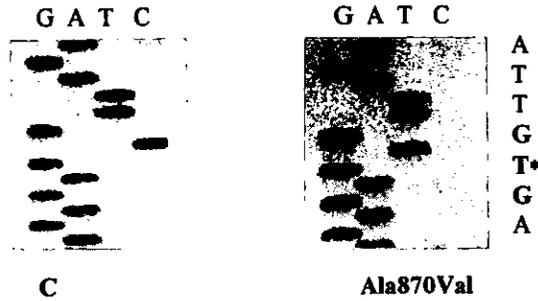
**EXON C**



**EXON G**

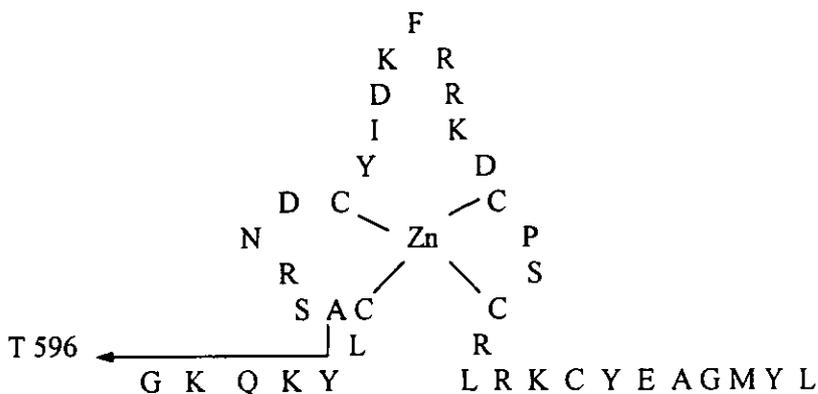


**EXON H**

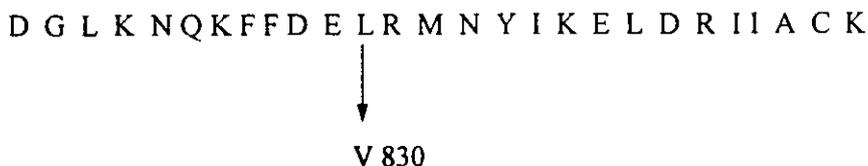


**Figura 9.** Mutaciones del RA en pacientes con SIA. Secuencia parcial de ADN de los exones C, G y H. La posición del intercambio de la base nitrogenada se indica mediante un asterisco. El ADN de sujetos normales sirvió de control (C).

### (A) Dominio de unión al DNA



### (B) Dominio de unión a los andrógenos



### (C) Dominio de unión a los andrógenos



**Figura 10.** Representación esquemática en la sustitución de aa de los 3 pacientes analizados con SIA. Segundo dedo de zinc del dominio de unión al DNA del RA, sustitución en el aa 596. Secuencia de aa codificada por el exón C (A). Sustitución en el aa 830, secuencia de aa del dominio de unión a los andrógenos codificado por el exón G (B). Sustitución en el aa 870 del dominio de unión a los andrógenos del RA, secuencia de aa codificada por el exón H (C).

## DISCUSIÓN

La diferenciación sexual y el desarrollo masculino dependen de la producción normal de andrógenos testiculares y la presencia en las células blanco de un RA funcional. Las mutaciones en el gen del RA dan como resultado una amplia gama de anomalías en el fenotipo sexual de individuos 46XY. En este estudio identificamos y determinamos las mutaciones puntuales en la región codificante del gen del RA con la subsecuente sustitución de su respectivo aa. Estas mutaciones en la región codificante constituyen cambios en los aa del RA, los que inducen una alteración en la secuencia de la proteína (estructura) y por lo tanto una pérdida de su función.

La caracterización y clonación del DNAc que codifica para el RA humano (Chang & col., 1988; Lubahn & col., 1988 a) ha permitido elucidar los defectos genéticos que causan los síndromes de insensibilidad a los andrógenos. Hasta ahora, los estudios efectuados nos indican que existe una gran heterogeneidad en los defectos moleculares que originan los diferentes grados de resistencia a la acción de los andrógenos.

El análisis molecular de más de 200 individuos afectados (Gottlieb & col., 1997) ha permitido observar defectos que van desde la delección completa del gen del RA, hasta mutaciones puntuales generalmente ubicadas en la región codificante del gen.

Las delecciones totales del gen son más bien raras, hasta ahora sólo se han reportado dos (Trifiro & col., 1991; Quigley & col., 1992). La apariencia fenotípica (fenotipo nulo) que presentan estos individuos resume las características más depuradas en cuanto a la resistencia completa a la acción de los andrógenos, incluyendo: un fenotipo completamente femenino con labios mayores hipoplásicos y presencia de hernias inguinales bilaterales. En la pubertad presentan un desarrollo mamario normal o aumentado y la ausencia completa de vello axilar y púbico. Presentan una talla mayor que las mujeres normales y no desarrollan acné.

La presencia de delecciones que abarcan una gran parte del gen del RA también se han observado, así se han visto delecciones del exón C al H (Brown & col., 1993), del exón D al H (Brown & col., 1988), delección del exón B (Quigley & col., 1992), delección del exón C (Akin & col., 1991),

deleción del exón E o deleción de los exones E, F y G en miembros de la misma familia (MacLean & col., 1993).

Debido a que este tipo de deleciones causan una alteración muy grande en el gen, los individuos afectados presentan un fenotipo totalmente femenino (SIA completo), aunque existen 2 excepciones, una es la reportada por Akin & col. (1991) en donde a pesar de tener deleción del exón D, el individuo se presenta como un hombre infértil, y el otro caso es en la deleción del intrón B, que lo informan como un SIA parcial (Ris- Stalpers & col., 1994).

Cabe mencionar que también se han encontrado deleciones menores (1 a 4 bases) en el gen del RA, estas mutaciones aunque son de menor tamaño que las anteriores causan una gran alteración, ya que pueden cambiar el marco de lectura del RNAm y producir una proteína no funcional (Batch & col., 1992).

La gran mayoría de alteraciones encontradas son debidas a mutaciones puntuales (sin sentido=nonsense), no por esto de menor importancia, ya que se ha observado que pueden resultar en la formación de un codón de terminación prematuro, lo que hace predecir la formación de una proteína receptora truncada, el tamaño de la proteína dependerá del sitio en donde se haya originado la mutación. Hasta ahora se han reportado 17 mutaciones que originan esta alteración, todas ellas han implicado un síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos.

También se ha informado de mutaciones de una sola base en sitios cercanos a la región de empalme y corte en la formación del RNAm, lo que implica un corte del intrón aberrante (Ris-Stalpers & col., 1990; Pinsky & col., 1992;).

Y por último, se han encontrado mutaciones de una sola base (erróneas=missense) que causan una substitución de aminoácido. Este tipo de mutaciones son las más encontradas comunmente en los pacientes con SIA, y es necesario tener una metodología adecuada para detectar con fineza el cambio de una sola base.

El análisis de las mutaciones puntuales encontradas hasta ahora, muestra que la mayoría se localiza en el dominio de unión al ligando (exones D, E, F, G y H), en segundo término se encuentran las localizadas en el dominio de unión al DNA (exones B y C) y en el dominio amino-terminal (exón A), la presencia de este tipo de mutaciones es escasa.

Además, se han podido localizar lugares de alta incidencia mutacional (“Hot spots”), mutaciones en los codones 615, 774, 840, 855 y 866 han sido observadas con mayor frecuencia dentro del gen del RA.

Los pacientes estudiados en el presente trabajo presentaron mutaciones erróneas, una en el dominio de unión al DNA y dos en el dominio de unión al ligando.

En el paciente 1 la mutación Ala596Thr se localizó en el dominio de unión al DNA en la base del segundo dedo de Zinc (Fig. 10A).

Para funcionar adecuadamente, el complejo hormona-receptor, debe unirse necesariamente a los genes blanco, y así dar la señal de inicio de la transcripción. Muy probablemente en este paciente, la unión del RA al DNA, no fue totalmente anulada ya que se desarrolló cierto grado de virilización. Una mutación similar en pacientes con SIA parcial fue informada por Klocker y col. (1992) y aunque ellos no miden la unión del RA al DNA, sí prueban la habilidad del receptor mutante para activar un promotor-hormona-dependiente en células COS-7 cotransfectadas, observando que el cambio G→C (2148) reduce en aproximadamente un 70% la habilidad del RA para activar la transcripción.

Todos estos datos indican que aunque la mutación se produjo en un sitio muy importante, el complejo hormona-receptor sí fue capaz de inducir algunas respuestas androgénicas en este paciente, hecho que se comprueba al inducir un crecimiento del falo mediante terapia con enantato de testosterona.

En el paciente 2 la mutación encontrada es una transversión C→G en el nucleótido 2850 localizado en el exón G, que originó en el paciente un fenotipo femenino, con ausencia de vello axilar y púbico, desarrollo mamario en Tanner IV-V e hipoplasia de labios menores, todo esto característico del SIA completo. La mutación Leu830Val no ha sido informada hasta la fecha, sin embargo en el codón 831 se han descrito tres diferentes alteraciones (Arg 831Stop, Arg831Leu y Arg831Gln) que resultaron en SIA completo (Gottlieb & col., 1999), lo que indica que esta región es de suma importancia en la función del RA.

De esta paciente no fue posible obtener una biopsia de piel para obtener fibroblastos y probar la unión del RA a su ligando marcado radiactivamente, de esta manera se hubiera podido establecer una relación entre la mutación y

la pérdida total o parcial de unión del andrógeno en el dominio de unión, que es en donde se localizó la mutación.

La mutación Ala870Val encontrada en el paciente 3, se encuentra en una región del RA involucrada en la unión del esteroide al receptor y es altamente conservada en algunas especies (Spencer & col., 1991).

En el paciente 3 se estudió la unión de DHT-<sup>3</sup>H al RA en fibroblastos de piel, y se observó que la unión era similar a la del control (P#3=34.92fmol/mgp, N=43 21 fmol/mgp), por lo que la mutación al parecer no afectó la unión del andrógeno a su receptor, esta unión aunque se establece, posiblemente no permita una señal totalmente adecuada para el inicio de la transcripción de proteínas andrógeno reguladas. El paciente presenta como características fenotípica, el desarrollo de ginecomastia, voz aguda y poco vello corporal, así como espermatozoides con una vida media baja, los genitales externos del paciente son normales, indicando que la mutación no afecta muy severamente la actividad de los andrógenos.

La mutación Ala870Val se observó con anterioridad (Hiort & col., 1994; Hiort & col., 1998 ) en pacientes con SIA parcial, estos pacientes a diferencia del estudiado en este trabajo, sí presentan hipospadias. Estas faltas de similitud en el fenotipo, se han observado en otras mutaciones, por ejemplo Arg774His, en donde unos pacientes presentan SIA parcial y otros SIA completo, lo que indica que no necesariamente una mutación dará un fenotipo pre-establecido.

El estudio del gen del RA en pacientes con SIA ayuda a conocer los sitios importantes del receptor para poder efectuar una actividad adecuada como factor transcripcional.

El RA es una de las pocas proteínas en las cuales una mutación no pone en peligro la vida del individuo, pero sí se hace muy evidente debido a la alteración del fenotipo en el individuo 46XY. Esto da la oportunidad de observar la gran variabilidad en el tipo de mutaciones que pueden ocurrir en los genes del humano.

## BIBLIOGRAFÍA

- ◆ **Akin JW, Behzadian A, Tho SPT & McDonough** (1991) Evidence for a partial deletion in the androgen receptor gene in a phenotypic male with azoospermia. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1891-1894.
- ◆ **Amero SA, Kretsinger RH, Moncrief ND, Yamamoto KR & Pearson WR** (1992) The origin of nuclear receptor proteins: A single precursor distinct from other transcription factors. *Mol Endocrinol* 6: 3-7.
- ◆ **Andersson S & Russell DW** (1990) Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3640-3644.
- ◆ **Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O & Camerino G** (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 7: 497-501.
- ◆ **Batch JA, Williams DM, Davies HR, Brown BD, Evans BAJ, Hughes IA & Patterson MN** (1992) Androgen receptor gene mutations identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 1: 479-503.
- ◆ **Beato M** (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.
- ◆ **Beato M & Sánchez-Pacheco A** (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17: 587-609.
- ◆ **Beitel LK, Prior L, Vasiliou DM, Gottlieb B, Kaufman M, Lumbroso R, Alvarado C, Mc Gillivray B, Trifiro M & Pinsky L** (1994) Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable  $\alpha$ -helical segments of the DNA-binding domain in the human androgen receptor. *Hum Mol Genet* 3: 21-27.
- ◆ **Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HCJ, Kuiper GGJM, Ris C, Klaassen P, van der Korput JAGM, Voorhorst MM, van Laar JH,**

- Mulder E & Trapman J** (1989) The human androgen receptor: Domain, structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 34: 307-310.
- ◆ **Brown TR, Lubahn DB, Wilson EM, Joseph DR, French FS & Migeon CJ** (1988) Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8151-8155.
  - ◆ **Brown TR, Scherer PA, Chang Y-T, Migeon CJ, Ghirri P, Murolo K & Zhou Z** (1993) Molecular genetics of human androgen insensitivity. *Eur J Pediatr* 152 [Suppl 2]: S62-S69.
  - ◆ **Chang G, Kokontis J & Liao S** (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptor. *Science* 240: 324-326.
  - ◆ **da Silva SM, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A & Lovell-Badge R** (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet* 14: 62-68.
  - ◆ **De Bellis A, Quigley CA, Cariello NF, El-Awady MR, Sar M, Lane MV, Wilson EM & French FS** (1992) Single base mutations in the human androgen receptor gene causing complete androgen insensitivity: Rapid detection by a modified denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Mol Endocrinol* 6: 1909-1920.
  - ◆ **De Bellis A, Quigley CA, Marschke KB, El-Awady MK, Lane MV, Smith EP, Sar M, Wilson EM & French FS** (1994) Characterization of mutant androgen receptors causing partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 513-522.
  - ◆ **Dever TE** (1999) Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci* 24: 398-403.
  - ◆ **Evans RM** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.

- ◆ **Faber PW, van Rooij HCJ, van der Korput HAGM, Baarends WM, Brinkmann AO, Grootegoed JA & Trapman J** (1991) Characterization of the human androgen receptor transcription unit. *J Biol Chem* 266: 10743-10749.
- ◆ **Faber PW, van Rooij HCJ, Schipper HJ, Brinkmann AO & Trapman J** (1993) Two different overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. *J Biol Chem* 268: 9296-9301.
- ◆ **Goodfellow PN & Lovell-Badge R** (1993) Sry and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27: 71-92.
- ◆ **Gottlieb B, Trifiro M, Lumbroso R, Vasiliou CM & Pinsky L** (1997) Androgen receptor gene mutation data base. *Nucleic Acids Res* 24: 151-4.
- ◆ **Gottlieb B, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L & Trifiro M** (1999) Update of the androgen gene mutation data base. *Human Mutat* 14: 103-114.
- ◆ **Graves JAM** (1997) Two uses for old SOX. *Nature Genet* 16: 114-115.
- ◆ **Griffin JE** (1992) Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 326: 611-618.
- ◆ **Griffin JE & Wilson JD** (1980) The syndromes of androgen resistance. *N Engl J Med* 302: 198-209.
- ◆ **Griffin JE & Wilson JD** (1998) Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Williams, Textbook of Endocrinology 9th Ed Wilson J and Foster D eds, Philadelphia Saunders, 819-875.
- ◆ **Grumbach MM & Conte FA** (1998) Disorders of the sex differentiation. In: Williams, Textbook of Endocrinology 9th Ed Wilson J and Foster D eds, Philadelphia Saunders, 1303-1425.
- ◆ **Hanukogly L** (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 779-804.

- ◆ **Hiort O, Huang Q, Sinnecker GHG, Sadeghi-Nejad A, Kruse K, Wolfe HJ & Yandell DW (1993)** Single strand conformation polymorphism analysis of androgen receptor gene mutations in patients with androgen insensitivity syndromes: Application for diagnosis, genetic counseling and therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 262-266.
- ◆ **Hiort O, Klauber G, Cendron M, Sinnecker GHG, Keim L, Schwinger E, Wolfe H & Yandel DW (1994)** Molecular characterization of the androgen receptor gene in boys with hipospadias. *Eur J Pediatr* 153: 317-321.
- ◆ **Hiort O, Sinnecker GHG, Holterhus P-M, Nitsche EM & Kruse K (1996)** The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. *Am J Med Genet* 63: 218-222.
- ◆ **Hiort O, Sinnecker GHG, Holterhus P-M, Nitsche EM & Kruse K (1998)** Inherited and novo androgen receptor gene mutations: Investigation of single-case families. *J Pediatr* 131: 939-943.
- ◆ **Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M & Omura T (1993)** Ad4BP Regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 268: 7494-7502.
- ◆ **Jenster G, van der Korput HAGM, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J & Brinkmann AO (1991)** Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 5: 1396-1404.
- ◆ **Jost A, Vigier B, Prépin J & Perchellet JP (1973)** Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 29: 1-41.
- ◆ **Kempainen JA, Lane MV, Sar M & Wilson EM (1992)** Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *J Biol Chem* 267: 968-974.
- ◆ **Klocker H, Kaspar F, Eberle J, Überreiter S, Radmayr C & Bartsch G. (1992)** Point mutation in the DNA binding domain of the androgen

- receptor in two families with Reifenstein Syndrome. *Am J Hum Genet* 50: 1318-1327.
- ◆ **Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H & Pérez-Palacios G (1982)** Diferenciación sexual. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin (Méx)* 34: 349-359.
  - ◆ **Koo YB, Ji I, Slaughter RG & Ji TH (1991)** Structure of the luteinizing hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology* 128: 2297-2308.
  - ◆ **Liljas A (1999)** Function is structure. *Science* 285: 2077-2078
  - ◆ **Lewis DFV & Lee-Robichaud P (1998)** Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP based on the CYP102 crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 66: 217-233.
  - ◆ **Lindquist S & Craig EA (1988)** The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 22: 631-677.
  - ◆ **Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS & Wilson EM (1988) (a)** The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol endocrinol* 2: 1265-1275.
  - ◆ **Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS & Wilson EM (1988) (b)** Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240: 327-330.
  - ◆ **Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM & French FS (1989)** Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9534-9538.

- ◆ **MacLean HE, Chu S, Warne GL & Zajac JD (1993)** related individuals with different androgen receptor gene deletions. *J Clin Invest* 91: 1123-1128.
- ◆ **Marcelli M, Tilley WD, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD & Mc Paul MJ (1992)** Molecular basis of androgen resistance. *J Endocrinol Invest* 15: 149-159.
- ◆ **McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Wilson CM, Griffin JE & Wilson JD (1992)** Mutations in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene cluster in two regions of the gene. *J Clin Invest* 90: 2097-2101.
- ◆ **Mitchell PJ & Tjian R (1989)** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.
- ◆ **Mooradian AD, Morley JE & Korenman SG (1987)** Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8: 1-28.
- ◆ **Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T (1989)** Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Genomics* 86: 2766-2770.
- ◆ **Parr BA & McMahon AP (1998)** Sexual dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires *Wnt-7a*. *Nature* 395: 707-710.
- ◆ **Pestova TV & Hellen CUT (1999)** Ribosome recruitment and scanning: what's new. *Trends Biochem Sci* 24: 85-87.
- ◆ **Pinsky L, Trifiro M, Kaufman M, Beitel LK, Mhatre A, Kazemi-Esfarjani P, Sabbaghian N, Lumbroso R, Alvarado C, Vasiliou M & Gottlieb B (1992)** Androgen resistance due to mutation of the androgen receptor. *Clin Invest Med* 15: 456-472.
- ◆ **Pratt WB & Toft DO (1997)** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18: 306-360.
- ◆ **Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, van**

**Heyningen V & Hastien N (1990)** The candidate Wilm's tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346: 194-197.

- ◆ **Quigley CA, Friedman KJ, Johnson A, Lafreniere RG, Silverman LM, Lubahn DB, Brown TR, Wilson EM, Willard HF & French FS (1992)** Complete deletion of the androgen receptor gene: Definition of the null phenotype of the androgen insensitivity syndrome and determination of carrier status. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 927-933.
- ◆ **Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM & French FS (1995)** Androgen receptor defects: Historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321.
- ◆ **Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifer KJ, Hirsch B, Hodgkin J & Zarkower D (1998)** Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.
- ◆ **Raymond CS, Parker DE, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter W, Bardwell VJ, Hirsch B & Zarkower D (1999)** A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8: 989-996.
- ◆ **Rey R & Picard J-Y (1998)** Embriology and endocrinology of genital development. *Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12: 17-33.
- ◆ **Reyes-Fuentes A & Veldhuis JD (1993)** Neuroendocrine physiology of the normal male gonadal axis. *Endocrinol and Metab Clin of North Ame* 22: 93-124.
- ◆ **Ris-Stalpers C, Kuiper GGJM, Faber PW, Schweikkert HU, van Rooij HCJ, Zagers ND, Hodgins MB, Degenhart HJ, Trapman J & Brinkmann AO (1990)** Aberrant splicing of androgen receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivit. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7866-7870.
- ◆ **Ris-Stalpers C, Verleun-Mooijman MCT, de Blaeij TJP, Degenhart HJ, Trapman J & Brinkmann AO (1994)** Differential splicing of human androgen receptor pre-mRNA in X-linked Reinfenstein syndrome,

because of a deletion involving a putative branch site. *Am J Hum Genet* 54: 609-617.

- ◆ **Roberts LM, Shen J & Ingraham HA** (1999) Human sexual development new solutions to an ancient riddle: Defining the differences between Adam and Eve. *Am J Hum Genet* 65: 933-942.
- ◆ **Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual Second Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory) Cold Spring Harbor, NY.
- ◆ **Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS & Wilson EM** (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266: 510-518.
- ◆ **Sinnecker GHG, Hiort O, Nitsche E, Holterbus PM & Kruse K** (1997) Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. *Eur J Pediatr* 156: 7-14.
- ◆ **Smith DF & Toft DO** (1993) Steroid receptor and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7: 4-11.
- ◆ **Spencer JA, Watson JM, Lubahn DB, Joseph DR, French FS, Wilson EM & Graves JAM** (1991) The androgen receptor gene is located on a highly conserved region of the X chromosomes of the marsupial and monotreme as well as eutherian mammals. *J Hered* 82: 134-139.
- ◆ **Sultan C, Lumbroso S, Poujol N, Belon C, Boudon C & Lobaccaro J-M** (1993) Mutations of androgen receptor gene in androgen insensitivity syndromes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46: 519-530.
- ◆ **Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G & Lovell-Badge R** (1998) Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.
- ◆ **Swain A & Lovell-Badge R** (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Dev* 13: 755-767.

- ◆ **Thornton JW & Kelley DB (1998)** Evolution of the androgen receptor: Structure-function implications. *BioEssays* 20: 860-869.
- ◆ **Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie X-Z & Dufau ML (1991)** Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) gene receptor. *J Biol Chem* 266: 11355-11359.
- ◆ **Trifiro M, Gottlieb B, Pinsky L, Kaufman M, Prior L, Belsham DD, Wrogemann K, Brown CJ, Willard HF, Trapman J, Brinkmann AO, Chang C, Liao S, Sergovich F & Jung J (1991)** The 56/58 kDa androgen-binding protein in male genital skin fibroblasts with a deleted androgen receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 75: 37-47.
- ◆ **Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N & McMahon AP (1999)** Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405-409.
- ◆ **Warne GL & Zajac JD (1998)** Disorders of sexual differentiation. *Endocrinol and Metab Clin of North Am* 27: 945-967.
- ◆ **Wilson JD, Griffin JE & Russell DW (1993)** Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14: 577-593.
- ◆ **Wolf DA, Herzinger T, Hermeking H, Blaschke D & Hörz W (1993)** Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol* 7: 924-936.
- ◆ **Wong C-i, Zhou Z-x, Sar M & Wilson EM (1993)** Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH<sub>2</sub>-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem* 268: 19004-19012.
- ◆ **Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kunn J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A & Koopman P (1995)** The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genet* 9: 15-20.
- ◆ **Yamamoto KR (1985)** Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* 19: 209-252.

## GLOSARIO

- Amenorrea** Ausencia de la menstruación.
- Amenorrea primaria** Ausencia del inicio de la menstruación durante la pubertad. Se genera por la ausencia del desarrollo en la formación de los órganos reproductores o trastornos glandulares.
- Aminoácido** Molécula orgánica de fórmula general  $R-CH(NH_2)COOH$  con grupos ácidos ( $COOH$ ) y básicos ( $NH_2$ ) y un grupo lateral R que es específico para cada aminoácido en particular.
- Autosoma** Cromosoma cuya presencia o ausencia no está asociada normalmente con la determinación de las diferencias entre los sexos.
- Clitoromegalia** Agrandamiento del clitoris.
- Codón** Triplete de nucleótidos adyacentes en el RNA mensajero que codifica para un aminoácido específico cargado en un RNA de transferencia específico, o bien para la terminación de la traducción.
- Cromosomas sexuales** Cromosomas asociados con la determinación de las diferencias entre los sexos.
- Deleción** Alteración que implica la pérdida de DNA o de parte de un cromosoma.
- DNA** (ácido desoxirribonucleico) Un ácido nucleico caracterizado por la presencia de un azúcar de tipo desoxirribosa en cada nucleótido.
- Euterios** Mamíferos que presentan un proceso de reproducción el cual implica la utilización de una placenta que nutre a las crías hasta un estado avanzado del desarrollo.
- Exón** Secuencia de nucleótidos de un gen que se transcribe a RNA mensajero y se empalma con otras secuencias transcritas que corresponden a otros exones del mismo gen. Estas secuencias son traducidas a polipéptidos.
- Fenotipo** Caracteres que constituyen las propiedades funcionales y estructurales de un organismo, determinados tanto genética como ambientalmente.
- Gen** Unidad del material genético, compuesta por una secuencia de nucleótidos, que proporciona una función específica, o bien codifica

para una cadena polipeptídica, o para una secuencia de ribonucleótidos utilizada como RNA ribosómico o RNA de transferencia.

**Ginecomastia** Desarrollo excesivo de las glándulas mamarias en el varón, incluso en cuanto a su función.

**Hidrofílico** Un compuesto o parte de un compuesto que tiene afinidad por moléculas de agua.

**Hipospadias** Anomalía en el desarrollo del varón cuya uretra se abre por debajo y a un lado del pene o en el perineo.

**Homología** Presencia de una característica similar, fenotípica o genotípica, en especies o grupos diferentes, debido a su descendencia a partir de un ancestro común.

**Homopolimérico** Un polímero compuesto por una serie de radicales idénticos.

**Inserción** Presencia de una adición amplia de pares de bases en el DNA.

**Intrón** Secuencia de nucleótidos de un gen que se encuentra intercalada entre dos exones. Las secuencias intrónicas se eliminan del RNA mensajero.

**Marsupiales (Metaterios)** Mamíferos que poseen, entre otras características, un proceso de reproducción durante el cual nacen crías diminutas que acaban de criarse en una bolsa (marsupio) presente en las hembras.

**Monotremas (Prototerios)** Mamíferos cuya característica es poner huevos y que en la actualidad están restringidos a Australasia (ornitorrinco y equidna).

**Mutación** Cambio en la secuencia de nucleótidos del material genético, que puede ser por una sustitución, por inserción, duplicación, delección o inversión.

**Oligonucleótidos** Polímero formado por uno o cuantos nucleótidos.

**Polimorfismo** Presencia de dos o más variantes genéticas o fenotípicas en una población. Habitualmente referido a las variaciones genéticas en las que la frecuencia de la variedad más escasa no se mantiene solamente por mutación.

**RNA** (ácido ribonucleico) Un ácido nucleico, caracterizado por la presencia de un azúcar ribosa en cada nucleótido, cuyas secuencias

sirven como RNA mensajero, RNA ribosómico y RNA de transferencia en las células y también como material genético en algunos virus.

**Traducción** Proceso de síntesis de proteínas que tiene lugar en el ribosoma y por el cual se unen diferentes aminoácidos en una cadena de secuencia particular (polipéptido), utilizando la información que aporta la secuencia particular de codones de un RNA mensajero.

**Transcripción** Proceso por el cual se inicia y se complementa la síntesis de una molécula de RNA, llevado a cabo por la enzima RNA polimerasa utilizando un molde de DNA.

**Virilización** Inducción o desarrollo de características sexuales secundarias masculinas, en especial la aparición de dichos cambios en la mujer.